

Az intracelluláris Ca^{2+} szignalizáció szerepe az exokrin hasnyálmirigy sejtek károsodásának kialakulásában heveny hasnyálmirigy gyulladás során

Ph.D. Tézis



Fanczal Júlia

Témavezetők: **Dr. Maléth József, Ph.D**

Dr. Hegyi Péter, Ph.D., D.Sc

Elméleti Doktori Iskola

I.sz. Belgyógyászati Klinika

Szegedi Tudományegyetem

Szeged, Magyarország

2020

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapját képező közlemények:

- I. **Fanczal J**, Pallagi P, Görög M, Diszházi G, Almássy J, Madácsy T, Varga Á, Csernay-Biró P, Katona X, Tóth E, Molnár R, Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Maléth J. TRPM2-mediated extracellular Ca^{2+} entry promotes acinar cell necrosis in biliary acute pancreatitis.
J Physiol. 2020 Jan 9; doi: 10.1113/JP279047
[IF2018: 4.95]
- II. Molnár R, Madácsy T, Varga Á, Németh M, Katona X, Görög M, Molnár B, **Fanczal J**, Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Pallagi P, Maléth J., Mouse pancreatic ductal organoid culture as a relevant model to study exocrine pancreatic ion secretion.
Lab Invest. 2020 Jan; doi: 10.1038/s41374-019-0300-3
[IF2018: 3.684]

Az értekezés alapját nem képező egyéb közlemények:

- III. Tóth E, Maléth J, Závogyán N, **Fanczal J**, Grassalkovich A, Erdős R, Pallagi P, Horváth G, Tretter L, Bálint ER, Rakonczay Z Jr, Venglovecz V, Hegyi P., Novel mitochondrial transition pore inhibitor N-methyl-4-isoleucine cyclosporin is a new therapeutic option in acute pancreatitis”
J Physiol. 2019 Dec; doi: 10.1113/JP278517
[IF2018: 4.95]
- IV. Szentesi A, Tóth E, Bálint E, **Fanczal J**, Madácsy T, Laczkó D, Ignáth I, Balázs A, Pallagi P, Maléth J, Rakonczay Z Jr, Kui B, Illés D, Márta K, Blaskó Á, Demcsák A, Párniczky A, Pár G, Gódi S, Mosztbacher D, Szücs Á, Halász A, Izbéki F, Farkas N, Hegyi P; Hungarian Pancreatic Study Group. Analysis of Research Activity in Gastroenterology: Pancreatitis Is in Real Danger
PLoS one. 2106 Oct 24; doi: 1.01371/jurnal.pone.0165244
[IF2015: 3.057]

Publikációk száma:	4 (1 első szerző)
Összesített impakt faktor:	16.641

1. Bevezetés

Az exokrin pankreasz fő szerepet játszik a táplálék megemésztésében a duodénumban fiziológiás körülmények között. A különböző patofiziológiás ingerek (mint például túlzott alkohol fogyasztás vagy az epe reflux) akut pankreatitist váltanak ki, ami egy gyakori, súlyos formájában magas halálozással járó betegség. A mirigy nagy része (~ 80%) acinus sejtekből, körülbelül 4% -a dukális sejtekből, 4% vérerekből, 8% az endokrin sejtekből és az extracelluláris mátrix sejtjeiből áll. Az exokrin hasnyálmirigyre jellemző a "faágyszerű" elrendeződés, melyben az acinus sejtek a faág végén helyezkednek el lobulusokba rendeződve. A táplálékfelvételre válaszolva a pankreasz acinus sejtek termelik és szekretálják az emésztő enzimeket. A hasnyálmirigy másik sejtje a dukális epitél sejtek melyek HCO_3^- -ban gazdag lúgos folyadékot választanak ki. A lúgos pankreasz szekréció kimossa az emésztőenzimeket a dukális "fából" és semlegesíti a savas közeget a duodénumba érve. Fiziológiás körülmények között az acinus sejtek védve vannak a korai és intracelluláris zimogének aktivációjától. Amikor ez a védő mechanizmus nem működik megfelelően, kialakul a hasnyálmirigy önmegsejtődése és AP-t indukálhat. Számos tanulmány arra utal, hogy az extra - és az intracelluláris Ca^{2+} fontos szerepet játszik a hasnyálmirigy proteáz aktivációjának megindításában.

1.1. *Pankreasz acinus sejtek intracelluláris Ca^{2+} szignalizációja*

Az exokrin pankreasz intracelluláris Ca^{2+} szignalizációja fő szerepet játszik emésztő enzim szekréciója valamint az ideg- és hormonstimulációja során. A termelt emésztő enzimek zimogén granulomokba csomagolódnak az acinus sejtek apikális pólusán, amelyek a szekretagóg stimulusok által indukált intracelluláris Ca^{2+} emelkedés hatására szabadulnak fel.

1.2. *Akut pankreatitisz*

Az akut pankreatitisz az egyik leggyakoribb a kórházi ellátást igénylő nem-malignus emésztőszervrendszeri megbetegedések között, ami jelentős klinikai és gazdasági terhet jelent. Az AP legfőbb etiológiai faktorai a túlzott alkoholfogyasztás és az epekövesség okozta biliáris pankreatitisz. A lokális szövődmények között szerepel a hasnyálmirigy szövet és a körülvevő zsigeri zsír nekrozisa, míg a szisztémás szövődményekben az akut tüdőkárosodás és a veseműködési zavarok dominálnak, amelyek többszervi elégtelenséghez vezetnek. Az átlagos

halálozási arány ~ 3%, de súlyos esetekben elérheti a 28-30% -ot. Az AP patogenezisének hátterében többféle folyamat állhat, azonban a betegség kialakulásának egyik fő alapmechanizmusaként a tartós intracelluláris Ca^{2+} túlterhelés okozta sejtoxicitást tartják számon. Az intracelluláris Ca^{2+} túlterhelés a tripszinogén korai aktiválásához, mitokondriális károsodásokhoz és sejtnekrózishoz vezethet az acinus sejtekben az epesav által kiváltott akut pankreatitisben. A biliaris pankreatitisz az egyik leggyakoribb formája az akut pankreatitisznek, bár a betegség kialakulásának mechanizmusa továbbra is vitatott. Amikor az epesav eljut a hasnyálmirigy exokrin sejtjeibe, számos megfigyelés azt mutatja, hogy az epesavak különféle intracelluláris változást indukálnak a hasnyálmirigy acinus és ductalis sejtjeiben, hozzájárulva a biliaris akut pankreatitisz kialakulásához. Az acinusokban az epesavak az intracelluláris Ca^{2+} tartós emelkedését idézik elő az inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP_3R) és a ryanodine receptor aktiválása következtében. Ezenkívül a tauroolithocholicid-3-szulfát mitokondriális károsodást vált ki az acinus sejtekben, csökkent intracelluláris ATP-termeléssel és a mitokondriális membránpotenciál elvesztésével ($\Delta\Psi\text{m}$).

1.3. Reaktív oxigén szabadgyökök szerepe a Ca^{2+} szignalizációban

Reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) a jelátvitelnek nélkülözhetetlen elemei a sejtben, melyek képződése az oxidáns és antioxidáns molekulák által egyensúlyozódik ki. A ROS-t a mitokondriális légzés során a mitokondriális elektronszállító lánc I. és III. komplexéből származik. Az utóbbi években a ROS számos hatását leírták az intracelluláris jelátvitelben. Az intracelluláris jelátvitel ezen szabályozásának példaként Booth és munkatársai igazolták, hogy az endoplazmatikus retikulum (ER) - mitokondrium határterületén található a H_2O_2 nanodomainje, amelyet citoplazmatikus Ca^{2+} emelkedés triggerel/aktivál, és a Ca^{2+} oszcillációk pozitív szabályozója. Az ilyen nanodomének az intraorganelláris kommunikáció fontos elemei. A ROS-termelésnek számos hatása van az ion csatornákra és pumpákra, melyek az intracelluláris Ca^{2+} szignalizációban vesznek részt. Ugyanakkor a kiegyensúlyozatlan ROS képződést feltételezik, mint kritikus lépés a betegségek patogenezisében, amely a lipid membránok, a fehérjék és a DNS megbontása révén valósul meg. Az AP patogenezisében leírták a ROS termelés meghatározó szerepét a hasnyálmirigy acinus sejtjeinek sorsában, erre bizonyítékként szolgál a menadion által indukált ROS kiváltotta apoptotikus sejthalál. Továbbá Booth és munkatársai, kimutatták az epesavak indukálta ROS képződését egerek és emberek hasnyálmirigy acinus sejtjeiben. Valamint

azt is demonstrálták, hogy epesavak hatására mitokondriumon belül ROS képződés történik, ami a mitokondriális Ca^{2+} növekedésétől függ. Továbbá az AP patogenezisében a gyulladásos reakció során a keringő neutrofilek által felszabadított ROS szintén hozzájárulhat a sejtkárosodás kialakulásához, valamint az AP helyi és szisztémás szövődményeinek kialakulásához.

1.4. *Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2)*

A TRPM2 tagja a TRP-csatornák Melastatin alcsaládjának, amely az egyik legnagyobb kationcsatorna-család. A TRPM2 egy non-szelektív Ca^{2+} -permeábilis kationcsatorna, mint a legtöbb TRP-csatorna, amely részt vesz a redox jelátvitellel és az oxidatív stresszel kapcsolatban lévő különféle fiziológiai és patofiziológiai folyamatokban. A TRPM2 expresszióját különféle sejttípusokban és szervekben kimutatták, mint például a hasnyálmirigy β -sejtek, lép, idegsejtek, csontvelősejtek, kardiomiociták és immunsejtekben, például T-limfocitákban, makrofágokban és neutrofilekben. A csatornát a ROS aktiválja oxidatív stressz hatására, a másik lehetséges aktivációs útja a szabad intracelluláris ADP-ribóz (ADPR) által, szabad intracelluláris Ca^{2+} jelenlétében. Az ADPR-t a poli (ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzim termeli az oxidatív stressz által kiváltott DNS károsodásra adott válaszként és elősegíti az apoptotikus sejthalált. Az ADPR másik lehetséges forrása a mitokondriumok, ahol az oxidatív stressz indukálhatja a szabad ADPR képződését. A TRPM2 legfontosabb szerepe a gyulladásos rendellenességek kialakulásában igazolódott. A monocitákban kimutatták, hogy a TRPM2-n keresztül történő Ca^{2+} beáramlás növeli a kemokin termelést, ami fokozott neutrofil beszívargást eredményez a gyulladásos bélbetegségben. Korábban leírták, hogy az intracelluláris Ca^{2+} túlterhelés károsítja az acinus sejteket, valamint az acinus sejt funkciójának (nyáltermelés) elvesztéséhez vezet a nyálmirigyekben. Valamint számos tanulmány írja le a TRPM2 expresszióját különféle hámsejtekben, ráadásul hangsúlyozza a csatorna központi szerepét az oxidatív-stressz okozta betegségek patogenezisében. Valószínű, hogy ezidáig a TRPM2 expresszióját vagy funkcióját exokrin hasnyálmirigy-sejtekben soha nem vizsgálták.

1.5. *3D organoidok, mint az epithél fiziológia modelljei*

Az elmúlt évtizedekben számos tanulmány kiemelte, hogy a 2-dimenziós sejtenyészeteknek számos limitációja van (ideértve a mesterséges sejtfelszíni interakciókat, a korlátozott membrán

kontaktusokat, és a sejt polaritásának hiányát), amelyek korlátozzák a potenciális kutatási felhasználásukat. Másrészt az emberi betegségek rágcslókban való modellezése jelentős különbségeket mutatnak az emberi betegség fenotípusától és kimenetelétől, ami gátolja a preklinikai eredmények klinikai hasznosításra történő átalakítását. Az utóbbi években háromdimenziós organoid kultúrák váltak potenciális preklinikai vizsgálatok eszközeivé a különböző betegségek modellezéséhez és a gyógyszerek szűréséhez. Mivel a sejt-sejt közötti érintkezés dominál az organoid sejt kultúrákban (OS) az organoidok gömb alakú felépítése miatt, úgy tűnik, hogy sokkal alkalmasabb a sejt eredeti mikrokörnyezetének reprezentálására ellentétben a 2D tenyészetekkel. A hasnyálmirigy-kutatásban jelenleg az organoid sejt kultúrákat tanulmányozzák, mint releváns emberi modell a szövet fejlődésének és karcinogenezisének. Az OS fent leírt előnyei miatt jobb modellek lehetnek az exokrin pankreasz kutatásában, azonban az OS funkcionális tulajdonságairól (például Ca^{2+} jelátvitelről) csak korlátozott információ áll rendelkezésre.

2. Célkitűzés

I. (1. számú publikáció)

A patológiás Ca^{2+} szignalizáció és a megnövekedett ROS mitokondriális károsodást, az intraacinaris emésztő enzimek aktiválódását és sejthalált okozhat. A TRPM2 egy nem szelektív kationcsatorna, amely nagy szerepet játszik az oxidatív stressz által kiváltott Ca^{2+} túlterhelésben különböző sejttípusokban, de expressziója és funkciója az exokrin hasnyálmirigyben még nem ismert. Ezért célul tűztük ki a következőket:

- A TRPM2 expressziójának karakterizálása az exokrin pankreaszban;
- felmérni a TRPM2 szerepét az epesav által kiváltott sejt károsodásban;
- megvizsgálni a TRPM2 szerepét az acinus sejtek sejthalálának típusának meghatározásában;
- a cerulein és az epesav által kiváltott AP összehasonlítása vad típusú (VT) és TRPM2 knock out (KO) egérben;

II. (2. számú publikáció)

Az organoid kultúrák megfelelő modellnek tűnnek az *in vitro* vizsgálatokhoz; habár ezidáig nincs információnk arról, hogyan alakul ki a Ca^{2+} szignalizáció az organoid epitél sejtekben.

Ezért célul tűztük ki a következőt:

- Ca^{2+} szignalizáció összehasonlítása elsődleges epitél sejtekben és organoidokban;

3. Anyagok és módszerek

3.1 Kísérleti állatok és etikai engedély

TRPM2 KO egereket nagylelkűen Yasuo Mori, a Kiotói Egyetemről (Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering) biztosította. A TRPM2 +/+ (VT) és a TRPM2 -/- (KO) egereket TRPM2 +/- állatok keresztezésével hoztuk létre és 8-12 hetes életkorban használtuk fel kísérletekben. A genotipizálást polimeráz láncreakcióval (PCR) végeztük, és szokásos agarózgél-elektroforézissel vizualizáltuk. Az egereket az NIH irányelv és a 2010/63 / EU irányelv tiszteletben tartása mellett használtuk a tudományos célokra. A tanulmányt az Állatkísérletek Országos Tudományos Etikai Testület XXI./2523/2018 engedélyszámmal fogadta el.

3.2. Pankreasz acinus sejtek izolálása

A VT és a TRPM2 KO egerek feláldozásához 250 mg/testtömegkg nátrium-pentobarbitál terminális érzéstelenítést használtunk. Az acinus sejteket enzimatis emésztéssel izoláltuk a hasnyálmirigyből.

3.2.1. Az egér hasnyálmirigy duktusz, duktális fragmentek és a hasnyálmirigy organoid tenyésztésének létrehozása

A pankreasz duktuszok izolálását mikrodisszekcióval végeztük. Az egér organoid kultúrák létrehozására a Boj és munkatársai által publikált protokollt alkalmaztuk.

3.3. Gén expressziós analízis

A TRPM2 gén expressziójának vizsgálatához a reverz transzkripció (RT-PCR) és a hagyományos PCR kombinációját alkalmaztuk. A cDNS-specifikus primerek (forward: ACGGGCAATATGGTGTGGAG; reverse: CACCTCCCCTTTCCTTCGTT). A primerek validálására egér agy lizátumot használtunk.

3.4. Immunofluoreszcens festés

A VT és a TRPM2 KO egerek acinar sejteit izolálást követően poli-L-lizinnel bevont tárgylemezre erősítettük. A fixálás és a blokkolás után egy éjszakán át 1:50 hígításban ATTO-594 konjugált nyúl poliklonális elsődleges antitesttel inkubáltuk (Anti-TRPM2 - ATTO-594; Alamone Labs; kat. Szám: ACC-043-AR) a mintákat 4 ° C-on. A sejtmagokat Hoechst33342-vel festettük. A képeket ZEISS LSM 880 konfokális mikroszkóp 40x víz alapú objektív segítségével készítettük.

3.5 Elektrofiziológia

Az elektrofiziológiai mérésekhez, egér hasnyálmirigy acinus sejteket használtunk az izolálás korábban leírtak szerint történt minimális módosításokkal. A teljes sejttáram mérése szobahőmérsékleten, egy Axopatch 200B erősítő és egy Digidata 1322A digitiser (Axon Instruments) segítségével történt, 50 kHz-es mintavételi frekvencián, és online szűrtük 5 kHz-en egy alacsony áteresztő Bessel-szűrőt használva. Az adatgyűjtést a p Clamp 9 szoftvercsomaggal (Axon Instruments) végeztük. A kation áramok rögzítése 100 ms hosszú tesztimpulzusok során történt -60 és +120 mV közötti lépéspotenciállal, mind kontrollált körülmények között a kezelés alatt.

3.6 Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérése aciáris sejtekben, ductalis fragmentekben és organoidokban

Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) mérése 5 μ M Fura-2-acetoxi-metil-észterrel (FURA-2-AM) történt ami egy Ca^{2+} érzékeny, fluoreszkáló festék. Az acinus sejteket 15 percig míg a duktális fragmentumokat és az organoidokat 30 percig töltöttük FURA-2-AM festékkel 0,05 % Pluronic F-127 jelenlétében. Egy a perfúziós kamra alapjaként szolgáló poli-L-lizinnel bevont fedőlaphoz (24 mm átmérőjű) rögzítettük az acinus, duktális és organoid sejteket, majd a perfúziós kamrát egy Olympus IX71 fordított mikroszkóphoz rögzítettünk, és különböző oldatokkal perfúzáltuk 37 ° C-on. A mérni kívánt területet (ROI) az Xcellence szoftver (Olympus) segítségével jelöltük ki, és a $[Ca^{2+}]_i$ változásait úgy határoztuk meg, hogy a sejteket egy MT20 fényforrással gerjesztettük, amely 340/11 és 380/11 nm gerjesztő szűrőkkel van felszerelve. Az gerjesztési és az emissziós hullámhosszokat 400 nm-es fénysugárral választottuk el, és a kibocsátott fényt egy 510/80 nm-es emissziós szűrőn át vezetődött. Az $[Ca^{2+}]_i$ változást F340 /

F380 fluoreszcencia arány alapján számoltuk.

3.7. Mitokondriális membrán potenciál mérés

A mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\Psi_m$) változását tetrametil-rodamiin-metil-észter (TMRM) alkalmazásával követtük nyomon, amely a mitokondriumokban halmozódik fel a $\Delta\Psi_m$ függvényében. A hasnyálmirigy acinus sejteket 100 nM TMRM-mel (ThermoFisher Scientific Cat.: T668) inkubáltuk HEPES oldatban 20 percig 37°C-on egy poli-l-lizinnel bevont fedőlemezen, majd különböző oldatokkal perfúzáltuk 37 ° C-on. A perfúziós oldatokhoz 100 nM TMRM festékkel egészítettük ki, hogy elkerüljük a festék szivárgását. A TMRM fluoreszcencia változását ZEISS LSM880 konfokális mikroszkóppal mértük, 40x vízimmerziós objektívet használva. A sejteket 543 nm hullámhosszon gerjesztettük, és a kibocsátott fényt 560 nm és 650 nm között vettük fel. Az ROI-kat az acinus sejtek mitokondriumain jelöltük ki. A fluoreszcens jeleket a kezdeti fluoreszcencia intenzitásra ($F1 / F0$) normalizáltuk, és relatív fluoreszcenciaként fejeztük ki.

3.8. Acinus sejt sorsának vizsgálata

Az acinus sejtek halálának meghatározásához apoptózis/nekrózis kitet használtunk (Abcam kat. Szám: ab176750) a gyártó utasításainak megfelelően. A VT és a TRPM2 KO egerekből származó hasnyálmirigy acinus sejteket olyan módosítással izoláltuk, hogy javítsuk a teljes sejtek túlélését (rövidebb szöveti emésztést és enyhe centrifugálást alkalmaztunk), és 1 mM H_2O_2 -vel vagy 250 μ M kenodezoxikol-savval (CDC) inkubáltuk 30 percig. A sejteket ezután centrifugáltuk és kétszer mostuk PBS-sel. A sejteket ezután újrasszuszpendáltuk 200 μ l Assay Pufferben, és szobahőmérsékleten 30–60 percig szobahőmérsékleten CytoCalcein 450, Nuclear Green és Apopxin Deep Red festékekkel töltöttük fel a sejteket. A sejteket Cellview sejttenyésztő lemezre (Greiner Bio-One, kat. Sz.: 543979) helyeztük a képalkotás céljából. A képeket Zeiss LSM880 konfokális mikroszkóppal, különböző csatornákkal és hullámhosszokkal, a különböző festékeknek megfelelően készítettük: CytoCalcein 450 (Ex/Em = 405/450 nm), Nuclear Green (Ex/Em = 490/520 nm) és Apopxin Deep Red (Ex/Em = 630/660 nm). Mindegyik esetben öt képet készítettünk, és két független vizsgáló számolta meg a sejtek teljes számát. A nukleáris zöldfestéssel rendelkező sejteket nekrotikusnak, az Apopxin Deep Red festékkel apoptotikusnak,

míg a kettős festésű sejteket nekrotikusnak tekintettük.

3.9. In vivo akut pankreatitisz modellek

A Cerulein által kiváltott akut pankreatitisz modell esetében 10 órás 50 µg/testtömeg kg cerulein injekcióval váltottuk ki intraperitóniásan beadva (a kontroll csoportok fiziológiás sóoldatot kaptak). Két órával az utolsó injekció után 85 mg/kg pentobarbitállal áldoztuk fel. A biliáris akut pankreatitisz modell esetében a közös epevezetékbe beadott 4% Na-taurocholate (TC) beadásával váltottuk ki Perides és munkatársai által leírtak szerint. Az egereket 24 óra elteltével áldoztuk fel pentobarbitál alkalmazásával (85mg/kg ip.). Mindkét esetben vérmintákat vettünk végső érzéstelenítés után az alsó vena cava-n keresztül, és a hasnyálmirigyet azonnal eltávolítottuk. A vérmintákat jégre helyezzük, majd 2500 RCF-en 15 percig 4°C-on centrifugáljuk. Szérummintákat szérum-amiláz aktivitás mérésére használtuk fel. A minták abszorbanciáját 405 nm-en detektáltuk egy FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech) microplate leolvasóval. A formaldehiddel fixált hasnyálmirigy mintákat paraffinba ágyaztuk, és 4 µm vastag metszeteket vágunk és hematoxilin – eozinnal festettük meg. A szövettani paramétereket, mint például az ödéma, a gyulladásos sejtek infiltrációja és a nekrosis három független vizsgáló ‘vakon’ végezte el. A teljes szövettani pontszámot az egyes pontszámok összeadásával számítottuk ki.

3.10. Statisztika

A statisztikai elemzést a GraphPad Prism szoftverrel végeztük. Az összes adat átlagban \pm SD. Mind a parametrikus (varianciaanalízis egyirányú elemzése), mind a nem parametrikus (Mann Whitney teszt, Kruskal Wallis teszt - az acinus sejtek túlélési vizsgálatának elemzésére) teszteket használtunk az adat eloszlás normalitása alapján. A 0,05-nél kisebb p értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

4. Eredmények

4.1. TRPM2 csatorna expressziója az exokrin pankreaszban

Az izolált acinusokon végzett végpont-PCR analízis megerősítette, hogy a TRPM2 gén expresszálódik az exokrin hasnyálmirigy sejtjeiben. Az izolált acinus klasztereken végzett TRPM2

immunfluoreszcens jelölés konfokális képei azt mutatták, hogy a TRPM2 csatornák hasnyálmirigy acinus sejtek bazolaterális membránján expresszálódnak.

4.2. A funkcionális TRPM2 csatorna jelenléte pankreasz acinus sejtekben

Amikor az izolált VT hasnyálmirigy acinus sejteket 1 mM H₂O₂-vel kezeltük ROS növekedés kiváltása érdekében, a $[Ca^{2+}]_i$ gyors és tartós növekedése volt megfigyelhető, amely szignifikánsan csökkent a TRPM2 KO acinus sejtekben ($0,41 \pm 0,09$) vs. $0,17 \pm 0,029$). Az extracelluláris Ca²⁺-mentes tápközegben kezelt sejtekben a Ca²⁺-szint emelkedése szignifikáns mértékben csökkent, a VT és a TRPM2 KO sejtek között nem tapasztaltunk különbséget. Ez arra utal, hogy a $[Ca^{2+}]_i$ tartós emelkedése H₂O₂-re adott válaszként nagyrészt a TRPM2-csatorna által közvetített extracelluláris Ca²⁺ beáramlásnak tudható be. Ezenkívül a H₂O₂ egy reverzibilis kationos membránáramot aktivált, egy relatív lineáris I – V kapcsolattal, ahogyan azt már korábban is leírták a TRPM2 esetében.

4.3. A TRPM2 hozzájárul az epesav által kiváltott extracelluláris Ca²⁺ beáramláshoz a hasnyálmirigy acinus sejtjeiben

Az epesavak fontos szerepet játszanak a biliáris pankreatitisz kialakulásában, Ca²⁺ felszabadulást idéznek elő az intracelluláris raktárakból, valamint kiváltják az extracelluláris Ca²⁺ beáramlást. Ezért tanulmányoztuk a TRPM2 szerepét ebben a folyamatban, megvizsgáltuk az epesavkezelés hatására az intracelluláris Ca²⁺ emelkedést a VT és a TRPM2 KO egerek hasnyálmirigy acinus sejtjeiben. A 250 μM CDC adagolása során megállapítottuk, hogy az $[Ca^{2+}]_i$ gyors és tartós növekedését váltja ki, amely a TRPM2 KO acinus sejtekben jelentősen csökkent ($0,834 \pm 0,02$ vs $0,655 \pm 0,04$). Ezek az eredmények rámutatnak, hogy a TRPM2 fontos szerepet játszik az epesav által kiváltott extracelluláris Ca²⁺ beáramlásban a hasnyálmirigy acinus sejtekben.

4.4. TRPM2 hiánya csökkenti az acinus sejtek nekrozisát az epesav expozíció során

A hasnyálmirigy acinus sejtjek sejtorsa meghatározza az AP súlyosságát. Emiatt fontosnak tartottuk a TRPM2 szerepének jellemzését az acinus sejthalálban. A kezeletlen kontroll mintákban az acinus sejtek ~ 85% -a volt életképes mind a VT, mind a TRPM2 KO mintákban, ami összehasonlítható a korábban közzétett eredményekkel. A VT és a TRPM2 KO acinus sejtek

inkubálása 1 mM H_2O_2 -vel történt 30 percen keresztül, ezen kezelés hatására jelentősen csökkent az életképes sejtek száma és a nekrotikus sejthalál jelentősen megnőtt. Megfigyelhető volt, hogy a TRPM2 hiánya megvédi az acinus sejteket az oxidatív stressz által kiváltott sejtnekrózistól a H_2O_2 kezelés alatt (az életképes sejtek % -ban: $19,4 \pm 0,4$ a VT acinus sejtekben, szemben a TRPM2 KO sejtekkel $49,1 \pm 1,2$). Az apoptózis aránya hasonló volt a TRPM2 KO és a VT acinus sejtek esetében (az apoptotikus sejtek % -ban: $9,1 \pm 4,3$ VT, $10,8 \pm 2,5$ TRPM2 KO), míg a nekrózis szignifikánsan csökkent a TRPM2 KO acinus sejtek esetében (a nekrotikus sejtek % -ban: $71,5 \pm 4,2$ VT vs. $40,1 \pm 3,2$ TRPM2 KO). Az acinus sejtek 30 percen keresztüli 250 μM CDC-vel történő inkubálása során is megfigyelhető volt az élő sejtek csökkent száma a VT mintában, de a sejtek túlélését jelentősen javította a TRPM2 delécio (az életképes sejtek % -ban: $48,3 \pm 0,9$ VT, $74,1 \pm 1,3$ a TRPM2 KO). A TRPM2 delécio szignifikánsan csökkentette mind az apoptotikus mind a nekrotikus sejthalálát a CDC-vel kezelt csoportban (VT: $15,4 \pm 2,5\%$ vs KO: $8,5 \pm 1,3\%$ és VT: $36,3 \pm 2,2\%$ vs KO: $17,4 \pm 1,3\%$). Megállapíthatjuk, hogy a TRPM2 csatornák hiánya $\sim 30\%$ -kal csökkentette az acinus sejtek halálát, ami arra utal, hogy a TRPM2 fontos szerepet játszik az acinus sejtek nekrózisában a biliáris AP során.

4.5. Epesav expozíció során a TRPM2 hiánya nem akadályozza meg a mitokondriális károsodást

A továbbiakban azokat az intracelluláris mechanizmusokat kívántuk jellemezni, melyek a TRPM2 csatorna által közvetített sejtnekrózisban játszanak szerepet. Mivel korábbi tanulmányok azt mutatták, hogy a TRPM2 mitokondriális károsodást idéz elő, ezért összehasonlítottuk a mitokondriális membránpotenciált ($\Delta\psi\text{m}$) a VT és a TRPM2 KO hasnyálmirigy acinus sejtekben. 1 mM H_2O_2 adagolása hatására a VT sejtekben jelentős $\Delta\psi\text{m}$ esés figyelhető meg. A $\Delta\psi\text{m}$ csökkenése szignifikánsan alacsonyabb volt a TRPM2 KO sejtekben, míg az extracelluláris Ca^{2+} eltávolítása károsította a $\Delta\psi\text{m}$ veszteséget a VT sejtekben a TRPM2 KO sejtek szintjéhez. Ez arra utal, hogy az extracelluláris Ca^{2+} beáramlás a TRPM2 révén döntő szerepet játszik a hasnyálmirigy acinus sejtekben tapasztalt oxidatív stressz által kiváltott mitokondriális károsodásokban. Következőekben összehasonlítottuk a $\Delta\psi\text{m}$ csökkenését 250 μM CDC-re adott válaszként is. A VT és a TRPM2 KO sejtek között azonban nem volt különbség. Ennek oka az epesavak Ca^{2+} független közvetlen mitokondriális toxicitása lehet. Korábbi tanulmányok leírták, hogy a TRPM2 csatornák a kulcs mediátorai a diabétikus stressz által kiváltott mitokondriális fragmentációnak az

epitéliális sejtekben. Azonban a hasnyálmirigy acinus sejtekben a mitokondriumok fragmentálódása nem volt megfigyelhető sem a H_2O_2 , sem az epesav kezelés hatására.

4.6. TRPM2 hiánya csökkenti a kísérleti epesavas pankreatitisz

Az akut pankreatitisz patogenezisében a TRPM2 szerepének meghatározására egy jól bevált AP kísérleti modellben hasonlítottuk össze a betegség súlyosságát VT és a TRPM2 KO állatokban. A cerulein által kiváltott pankreatitisz kísérleti modellben nem volt szignifikáns különbség a VT és a TRPM2 KO egerek között. Mindkét csoport kontroll állataiban normálisak voltak a hasnyálmirigy szövettani paraméterei, míg a cerulein hiperstimuláció kiterjedt hasnyálmirigy-károsodást okozott. Ennek ellenére nem volt megfigyelhető szignifikáns különbség a VT és a TRPM2 KO állatok szövettani paraméterei között. Az intersticiális ödéma kiterjedése (VT: $3,14 \pm 0,25$; KO: $3,03 \pm 0,34$), leukocita infiltráció (VT: $2,74 \pm 0,53$; KO: $3,04 \pm 0,23$, $p = 0,08$) és a nekrosis (VT: $18,64 \pm 3,16$; KO: $21,32 \pm 3,58$) esetében nem mutatott szignifikáns különbséget a ceruleinnal kezelt állatok csoportja. Szintén megvizsgáltuk a TRPM2 csatorna szerepét a biliáris AP patogenezisében. Ebben a modellben a hasnyálmirigy gyulladást 4%-os Na-taurocholate intraduktális infúzióval indukálták (a kontrollállatok fizioológiás sóoldatot kaptak), a korábban leírtak szerint. A 4%-os Na-taurocholate infúzió nekrotizáló pankreatitist indukált mind a VT, mind a TRPM2 KO egerekben, hisztológiai és laboratóriumi paraméterekkel együtt. Az intersticiális ödéma (VT: $2,8 \pm 0,16$; KO: $2,7 \pm 0,2$), és a leukocita infiltráció (VT: $3,3 \pm 0,38$; KO: $2,7 \pm 0,29$, $p = 0,08$) nem különbözött szignifikánsan a Na-taurocholate-tal kezelt csoportokban. A nekrosis mértéke észrevehetően szignifikánsan magasabb volt a VT csoportban, összehasonlítva a TRPM2 KO állatokkal (VT $41,3\% \pm 7,13\%$ vs. KO $26,4\% \pm 5,5\%$). Ezen eredményekkel összhangban vannak a szérum amiláz aktivitások szintjével is a Na-taurokoláttal kezelt VT állatokban a szignifikánsan magasabbak voltak a TRPM2 KO csoporthoz képest. Ezen eredmények alátámasztják az in vitro kísérletekben kapott eredményeket, megerősítve a TRPM2 csatorna döntő szerepét a biliáris AP patogenezisében.

4.7. Intracelluláris Ca^{2+} szignalizáció pankreasz organoidokban

Az epitelélettan és patológia új 3D modelljeiként tartják számon az organoid kultúrákat, amelyeknek számos előnye van (lásd a bevezetésben). Ezért az OS lehet, hogy jobb modell az

exokrin hasnyálmirigy kutatásában; azonban az OS-k funkcionális tulajdonságairól (például a Ca^{2+} szignalizációról) csak korlátozott információ áll rendelkezésre. Ennek vizsgálatához összehasonlítottuk a Ca^{2+} szignalizációt az elsődleges hasnyálmirigy duktuszokban és organoid sejtekben. A Ca^{2+} felszabadításához az endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} raktáraiból két Ca^{2+} mobilizáló agonistát (ATP és karbachol) használtunk. Megfigyeltük, hogy mindkét agonista a Ca^{2+} plató szintjének elérését indukálta a vizsgált koncentrációkban. Ezek a jelek nem mutattak szignifikáns különbségeket a maximális válaszban. Összehasonlítottuk a raktár vezérelt (store operated) Ca^{2+} belépést is, amelyet az ER raktárainak kiürülése okozott. Ezen vizsgálatok eredményeként azt tapasztaltuk, hogy a 25 μM ciklopiazonsav (CPA) által kiváltott ER Ca^{2+} felszabadulás szignifikánsan magasabb volt az izolált duktuszokban, míg a Ca^{2+} beáramlás szignifikánsan nagyobb az OS-kben. Azonban ezen jelenségek biológiai relevanciájának meghatározásához további vizsgálatok szükségesek.

5. Megbeszélés

5.1. A TRPM2-mediált extracelluláris Ca^{2+} belépés elősegíti az acinus sejtek nekrozisát biliáris akut pankreatitiszében

Számos publikáció szerint az epesavak meghosszabbítják az intracelluláris Ca^{2+} emelkedést, fokozzák a ROS termelést és károsíthatják a hasnyálmirigy acinus sejtek mitokondriumait. Ezek a patológiás változások idézik elő az AP kialakulását, ezt a súlyos gasztrointesztinális betegséget, amelynek nincs specifikus kezelése. A TRPM2 szerepét már korábban leírták Ca^{2+} -függő sejtkárosodás kialakulásában, mint ROS-érzékeny nem specifikus kationcsatorna, azonban a TRPM2 lehetséges szerepét az AP patogenezisében még nem vizsgálták. A TRPM2 expresszióját korábban már leírták különféle sejttypusokban, köztük gyulladásos sejtekben, myocytákban és epitheliális sejtekben bizonyították. Ez az első tanulmány, amely a TRPM2 expresszióját demonstrálja az exokrin hasnyálmirigyben. A konvencionális PCR és immunfestési technikák alkalmazásával igazoltuk a TRPM2 expresszióját az acinus sejtek bazolaterális membránjában. A megnövekedett intracelluláris ROS kiváltja a TRPM2 mediált extracelluláris Ca^{2+} beáramlást. Az intracelluláris Ca^{2+} jelátvitel az exokrin hasnyálmirigy egyik fő jelátviteli útvonala, amely szabályozza az emésztő enzimek szekrécióját az acinus sejtekben, valamint az ion- és folyadékszekréciót a ductalis sejtekben. Ezért lehetséges, hogy a TRPM2 által közvetített Ca^{2+}

beáramlás hozzájárulhat a fiziológiai jelátvitelhez, bár ennek megerősítéséhez további vizsgálatok szükségesek. Számos tanulmány bizonyítja, hogy az intracelluláris Ca^{2+} homeosztázis zavara központi szerepet játszik az epesav által kiváltott exokrin pankreasz sejtkárosodásban. Hasnyálmirigy acinus sejtekben az epesavak dózisfüggő intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedést váltanak ki az IP_3 és a ryanodin receptorok aktiválásával. Kísérleteink során a CDC használatát követően az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mennyiség megnövekedett az acinus sejtekben, mindemellett a TRPM2 genetikai delécioja acinus sejtekben csökkentette a Ca^{2+} emelkedését. A tanulmányunk eredményei azt mutatják, hogy a TRPM2 csatorna ~22% -ban járul hozzá az epesav által generált Ca^{2+} szignálhoz az acinus sejtekben.

Az intracelluláris Ca^{2+} túlterhelés a tripszinogén korai aktiválódásához, mitokondriális károsodásokhoz és sejtek nekrozisához vezethet az acinus sejtekben. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a TRPM2 kiesése a hasnyálmirigy acinus sejtjeinek jelentős védelmét eredményezte a H_2O_2 és az epesav által kiváltott sejt nekrozis ellen. Fontos megemlíteni, hogy ezt a védelmet a epesav indukált AP-ban is megfigyeltük, mivel a nekrozis mértéke a TRPM2 knockout egerekben szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a VT társaiknál.

Mivel az epesavak gátolják a sejtek ATP-termelést és csökkentik a $\Delta\Psi_m$, ezért összehasonlítottuk az $\Delta\Psi_m$ változásait epesav kezelés hatására a TRPM2 KO és VT acinus sejtekben. A TRPM2 genetikai kiesése és az extracelluláris Ca^{2+} eltávolítása jelentősen csökkentette $\Delta\Psi_m$ csökkenését, arra utalva, hogy a TRPM2-n keresztül történő extracelluláris Ca^{2+} beáramlás, döntő szerepet játszik az oxidatív-stressz által kiváltott mitokondriális károsodásokban. Ennek ellenére az epesavval kezelt sejtekben nem észleltük ezt a védőhatást, melyet az epesavak Ca^{2+} független direkt mitokondriális toxicitása magyarázhat. Korábban kutatócsoportunk és más kutatók is arról számoltak be, hogy az epesavak toxikus hatásait nem lehet teljesen megszüntetni az intracelluláris Ca^{2+} emelkedés megszüntetésével. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az epesavak számos különféle módon indukálhatják a mitokondriális károsodást, függetlenül az intracelluláris Ca^{2+} túlterheléstől. Másrészt, a mitokondriális károsodástól függetlenül, az epesavak más Ca^{2+} -függő toxikus hatásai is vannak, amelyek szintén hozzájárulhatnak az acinus sejt nekrozishoz.

Kísérleteinkben generális TRPM2 knockout egereket alkalmaztunk, ezért más tényezők hozzájárulhatnak a TRPM2 delécio megfigyelt védőhatásához akut biliáris pankreatitisz esetén. Köztudott, hogy a gyulladásos sejtek hozzájárulnak az akut pankreatitisz súlyosságához.

Összegezve, elmondhatjuk, hogy a legjobb tudásunk szerint ez az első tanulmány a TRPM2 csatorna expressziójáról és kóros funkciójáról az exokrin hasnyálmirigyben. Kimutattuk, hogy a hasnyálmirigy acinus sejtjei funkcionálisan aktív TRPM2-t expresszálnak, amelyet a megnövekedett oxidatív stressz aktiválhat. A kísérleteinkkel igazultuk, hogy a TRPM2 aktivitás hozzájárul az epesav által kiváltott extracelluláris Ca^{2+} beáramláshoz az acinus sejtekben, amely elősegíti az acinus sejt nekrozist a mitokondriális károsodásoktól függetlenül és növeli az epesav által kiváltott kísérletes pankreatitisz súlyosságát. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a TRPM2 gátlása potenciális lehetőség lehet a biliáris pankreatitisz kezelésében.

5.2. Intracelluláris Ca^{2+} szignalizáció pankreasz organoidokban

A hasnyálmirigy exokrin szekréciós folyamatainak tanulmányozása kihívás a primer epiteliális sejteken végzett kutatások során. A hasnyálmirigy kutatásban jelenleg az organoid sejt kultúrákat tanulmányozzák, mint a szövet fejlődés és karcinogenezis releváns emberi modelljét. Az OS nemrégiben a szöveti fiziológia és a patofiziológia ex vivo ígéretes modelljeivé váltak. Az organoid sejt kultúrák 3D önszerveződésű, szervekhez hasonló, *in vitro* létrehozott sejttenyészetek, amelyekben fennmarad a sejt-sejt közötti kapcsolat. Korábbi tanulmányok szerint az OS sejtjei fenntartják a szövetspecifikus génexpressziót, a sejt morfológiáját és működését, valamint a rosszindulatú betegségek jellemzőit is mutatja. Habár az organoidokat egyre több vizsgálatban használják, fiziológiás relevanciájukról csak korlátozott mennyiségű kísérleti adat áll rendelkezésre, különösen a hasnyálmirigy organoid sejt kultúrák esetén. Ezen kérdések megválaszolásához kísérleteink során összehasonlítottuk az epiteliális sejtek Ca^{2+} jelátvitelét az egér elsődleges hasnyálmirigy duktuszokban és az organoidokban. Az endoplazmatikus retikulumból való Ca^{2+} felszabadításához két Ca^{2+} mobilizálót használtunk, ATP és karbacholt, ahol mindkét agonista hatására a Ca^{2+} plató csúcs elérését indukált. Nem találtunk szignifikáns különbség a maximális válaszbán, de a Ca^{2+} felszabadulása valamivel alacsonyabb volt az organoidban, mint az izolált duktuszokban. A CPA által felszabadított ER Ca^{2+} magasabb volt az izolált duktuszban, míg a Ca^{2+} beáramlás szignifikánsan nagyobb az organoidokban. Ezen megfigyelések további vizsgálatot igényelnek, hogy meghatározhassuk a biológiai relevanciáját.

6. Az új eredmények összefoglalása

- Ez az első tanulmány, amely a TRPM2 expresszióját demonstrálja az exokrin hasnyálmirigyben.
- Leírtuk, hogy a TRPM2 expresszálódik a hasnyálmirigy acinus sejtek plazmamembránjában.
- A H_2O_2 aktiválja a TRPM2-t a hasnyálmirigy acinus sejtekben, ezt igazolja az intracelluláris Ca^{2+} emelkedés és a kationos karakterisztikus áramok, amik a TRPM2 knockout acinus sejtekeben nem volt megfigyelhető.
- Az epesavak aktiválják a TRPM2 által közvetített extracelluláris Ca^{2+} beáramlást.
- A H_2O_2 és az epesav által kiváltott nekrotikus sejthalál jelentősen csökkent a TRPM2 knockout egerek acinus sejtjeiben, ami arra utal, hogy a TRPM2 figyelemre méltó szerepet játszik az acinus sejtek sejt sorsában.
- Az epesav által kiváltott (de nem a cerulean által kiváltott) kísérleti AP súlyossága alacsonyabb volt a TRPM2 knockout egerek estében, ami arra utal, hogy a TRPM2 új gyógyszerterápiás célpontot jelenthet a biliáris pankreatitisz kezelésében.
- Az agonisták által indukált intracelluláris Ca^{2+} jelátvitel hasonló volt az izolált hasnyálmirigy duktuszokban és a hasnyálmirigy organoidokban, bár a CPA által kiváltott ER Ca^{2+} felszabadulás nagyobb volt az izolált duktuszokban, mint az organoidokban, míg a Ca^{2+} beáramlás szignifikánsan magasabb volt az organoidokban.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki segített és inspirált a doktori tanulmányaim során. Mindenekelőtt, szeretném kifejezni legmélyebb hálámat témavezetőmnek **Dr. Maléth Józsefnek** minden segítségért, támogatásért és útmutatásért az évek során. Az ő tudása, hozzáállása és tanácsai és segítettek munkám során, nélküle ez a disszertáció nem jöhetett volna létre. Szeretnék köszönetet mondani másik témavezetőmnek **Prof. Dr. Hegyi Péternek**, a Pécsi Tudományegyetem Transzlációs Orvostudományi Intézetének elnökének a támogatásáért és a tudományos tanácsokért.

Szeretnék köszönetet mondani **Prof. Dr. Lengyel Csabanak** és **Dr. Ábrahám Györgynek**, a Szegedi Tudományegyetem Orvostudományi Tanszékének jelenlegi és volt vezetőjének, valamint

Dr. Varró Andrásnak (az Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Tanszékének korábbi vezetője), akik lehetőséget adtak számomra, hogy az intézményeikben dolgozzak. Külön köszönet illeti **Dr. Pallagi Petrát** az együttműködésért és a tudományos tanácsokért az elmúlt évben. Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Prof. Dr. Rakonczay Zoltánnak** (Szegedi Tudományegyetem Kórélettani Intézet) a tudományos tanácsokért.

Szeretnék köszönetet mondani kollégáimnak és barátaimnak (ábécé sorrendben), **Ancsányi Kitti, Bálint Réka Emese, Dr. Becskeházi Eszter, Berczeli Orsolya, Dr. Csernay-Bíró Péter, Dr. Balla Zsolt, Déri Szilvia, Dobai Klaudia, Ébert Attila, Gréta Elekes, Fűr Gabriella, Gál Eleonóra, Gyömbér Zsuzsanna, Görög Marietta, Grassalkovich Anna, Katona Xénia, Kelemen Evelyin, Koncz Balázs, Dr. Kormányos Eszter, Lőrincz Anett, Madácsy Tamara, Molvid Déte, Dr. Tàlas, Tóth prpád, Tóth Emese, Dr. Venglovecz Viktória** minden segítségért, bátorításért, támogatásért, az együtt töltött felejthetetlen és nagyszerű időkért, akik nélkül ez a tézis nem jöhetett volna létre. Továbbá köszönöm a nagyszerű aszisztenciának: **Pritz Tünde, Miklósné Árva, Rea Fritz, Tóth Zsolt, Szabó Nikoletta, Magyarné Pálfi Edit és Zoltánné Fuksz † Erzsébet** a sok segítségért és támogatásért.

Külön köszönet illeti **Disziházi Gyulát** és **Dr. Almássy Jánost** (Debreceni Egyetem Élettani Tanszéke) a kiemelkedő kollaborációjukért.

Különösen hálás vagyok barátomnak, **Dr. Ruivo Ernestonak** sok szeretetért, segítségért, türelemért és támogatásért a tanulmányaim alatt. Végül, de nem utolsósorban, nagyon hálásan köszönöm szüleimnek, **Fanczalné Rácz Juliannának, Fanczal Istvánnak** és testvéreimnek, **Fanczal Bencének, Dr. Fanczal Eszternek, Fanczal Sárának** minden szeretetükért, támogatásáért, végtelen türelmükért, bátorításáért és, hogy mindig ott voltak nekem.

Nekik ajánlom ezt a tézist!